

*09/938,540*

# BUNDESREPUBLIK DEUTSCHLAND



## Prioritätsbescheinigung über die Einreichung einer Patentanmeldung

**Aktenzeichen:** 101 10 052.3  
**Anmeldetag:** 02. März 2001  
**Anmelder/Inhaber:** Degussa AG,  
Düsseldorf/DE  
**Bezeichnung:** Neue für das ccpA1-Gen kodierende  
Nukleotidsequenzen  
**Priorität:** 26.08.2000 DE 100 42 054.0  
**IPC:** C 12 N, C 12 Q, C 07 H

Die angehefteten Stücke sind eine richtige und genaue Wiedergabe der ursprünglichen Unterlagen dieser Patentanmeldung.

München, den 07. Juni 2001  
Deutsches Patent- und Markenamt  
Der Präsident  
Im Auftrag



**Neue für das ccpA1-Gen kodierende Nukleotidsequenzen**

Gegenstand der Erfindung sind für das ccpA1-Gen kodierende Nukleotidsequenzen aus coryneformen Bakterien und ein Verfahren zur fermentativen Herstellung von Aminosäuren,  
5 insbesondere L-Lysin, durch Abschwächung des ccpA1-Gens. Das ccpA1-Gen kodiert für das CcpA1-Protein, welches ein Katabolit-Kontroll-Protein A ist.

**Stand der Technik**

L-Aminosäuren, insbesondere L-Lysin, finden in der  
10 Humanmedizin und in der pharmazeutischen Industrie, in der Lebensmittelindustrie und ganz besonders in der Tierernährung Anwendung.

Es ist bekannt, daß Aminosäuren durch Fermentation von Stämmen coryneformer Bakterien, insbesondere  
15 Corynebacterium glutamicum, hergestellt werden. Wegen der großen Bedeutung wird ständig an der Verbesserung der Herstellverfahren gearbeitet. Verfahrensverbesserungen können fermentationstechnische Maßnahmen wie zum Beispiel Rührung und Versorgung mit Sauerstoff, oder die  
20 Zusammensetzung der Nährmedien, wie zum Beispiel die Zuckerkonzentration während der Fermentation, oder die Aufarbeitung zur Produktform durch zum Beispiel Ionenaustauschchromatographie oder die intrinsischen Leistungseigenschaften des Mikroorganismus selbst  
25 betreffen.

Zur Verbesserung der Leistungseigenschaften dieser Mikroorganismen werden Methoden der Mutagenese, Selektion und Mutantenauswahl angewendet. Auf diese Weise erhält man Stämme, die resistent gegen Antimetabolite oder auxotroph  
30 für regulatorisch bedeutsame Metabolite sind und die Aminosäuren produzieren.

Seit einigen Jahren werden ebenfalls Methoden der rekombinanten DNA-Technik zur Stammverbesserung von L-Aminosäure produzierenden Stämmen von *Corynebacterium* eingesetzt.

### 5 Aufgabe der Erfindung

Die Erfinder haben sich zur Aufgabe gestellt, neue Maßnahmen zur verbesserten fermentativen Herstellung von Aminosäuren, insbesondere L-Lysin, bereitzustellen.

### Beschreibung der Erfindung

- 10 Werden im folgenden L-Aminosäuren oder Aminosäuren erwähnt, sind damit eine oder mehrere Aminosäuren einschließlich ihrer Salze, ausgewählt aus der Gruppe L-Asparagin, L-Threonin, L-Serin, L-Glutamat, L-Glycin, L-Alanin, L-Cystein, L-Valin, L-Methionin, L-Isoleucin, L-Leucin, L-Tyrosin, L-Phenylalanin, L-Histidin, L-Lysin, L-Tryptophan und L-Arginin gemeint.

Werden im folgenden L-Lysin oder Lysin erwähnt, sind damit auch die Salze wie z.B. Lysin-Monohydrochlorid oder Lysin-Sulfat gemeint.

- 20 Gegenstand der Erfindung ist ein isoliertes Polynukleotid aus coryneformen Bakterien, enthaltend eine für das ccpA1-Gen kodierende Polynukleotidsequenz, ausgewählt aus der Gruppe

- a) Polynukleotid, das mindestens zu 70% identisch ist mit einem Polynukleotid, das für ein Polypeptid kodiert, das die Aminosäuresequenz von SEQ ID No. 2 enthält,
- b) Polynukleotid, das für ein Polypeptid kodiert, das eine Aminosäuresequenz enthält, die zu mindestens 70% identisch ist mit der Aminosäuresequenz von SEQ ID No. 2,

- c) Polynukleotid, das komplementär ist zu den Polynukleotiden von a) oder b), und
- d) Polynukleotid, enthaltend mindestens 15 aufeinanderfolgende Nukleotide der Polynukleotidsequenz von a), b) oder c),

wobei das Polypeptid bevorzugt die Aktivität des Katabolit-Kontroll-Proteins CcpA1 aufweist.

Gegenstand der Erfindung ist ebenfalls das oben genannte Polynukleotid, wobei es sich bevorzugt um eine

replizierbare DNA handelt, enthaltend:

- (i) die Nukleotidsequenz, gezeigt in SEQ ID No.1 oder
- (ii) mindestens eine Sequenz, die der Sequenz (i) innerhalb des Bereichs der Degeneration des genetischen Kodes entspricht, oder

mindestens eine Sequenz, die mit den zu den Sequenzen (i) oder (ii) komplementären Sequenzen hybridisiert, und gegebenenfalls

- (iv) funktionsneutralen Sinnmutationen in (i).

Weitere Gegenstände sind:

eine replizierbare DNA, enthaltend die Nukleotidsequenz, wie in SEQ ID No.1 dargestellt;

ein Polynukleotid, das für ein Polypeptid kodiert, das die Aminosäuresequenz, wie in SEQ ID No. 2 dargestellt, enthält;

ein Vektor, enthaltend Teile des erfindungsgemäßen Polynukleotids, mindestens aber 15 aufeinanderfolgende Nukleotide der beanspruchten Sequenz;

und coryneforme Bakterien, in denen das ccpA1-Gen, insbesondere durch eine Insertion oder Deletion, abgeschwächt ist.

Gegenstand der Erfindung sind ebenso Polynukleotide, die im wesentlichen aus einer Polynukleotidsequenz bestehen, die erhältlich sind durch Screening mittels Hybridisierung einer entsprechenden Genbank eines coryneformen Bakteriums, die das vollständige Gen oder Teile davon enthält, mit einer Sonde, die die Sequenz des erfindungsgemäßen Polynukleotids gemäß SEQ ID No.1 oder ein Fragment davon enthält und Isolierung der genannten Polynukleotidsequenz.

Polynukleotidsequenzen gemäß der Erfindung sind als Hybridisierungssonden für RNA, cDNA und DNA geeignet, um Nukleinsäuren, beziehungsweise Polynukleotide oder Gene in voller Länge zu isolieren, die für das CcpA1-Protein kodieren oder um solche Nukleinsäuren beziehungsweise Polynukleotide oder Gene zu isolieren, die eine hohe Ähnlichkeit mit der Sequenz des ccpA1-Gens aufweisen.

Polynukleotidsequenzen gemäß der Erfindung sind weiterhin als Primer geeignet, mit deren Hilfe mit der Polymerase-Kettenreaktion (PCR) DNA von Genen hergestellt werden kann, die für das CcpA1-Protein kodieren.

Solche als Sonden oder Primer dienende Oligonukleotide enthalten mindestens 30, bevorzugt mindestens 20, ganz besonders bevorzugt mindestens 15 aufeinanderfolgende Nukleotide. Geeignet sind ebenfalls Oligonukleotide mit einer Länge von mindestens 40 oder 50 Nukleotiden.

„Isoliert“ bedeutet aus seinem natürlichen Umfeld herausgetrennt.

„Polynukleotid“ bezieht sich im allgemeinen auf Polyribonukleotide und Polydeoxyribonukleotide, wobei es sich um nicht modifizierte RNA oder DNA oder modifizierte RNA oder DNA handeln kann.

Die Polynukleotide gemäß Erfindung schließen ein Polynukleotid gemäß SEQ ID No. 1 oder ein daraus hergestelltes Fragment und auch solche ein, die zu wenigstens 70%, bevorzugt zu wenigstens 80% und besonders zu wenigstens 90% bis 95% identisch sind mit dem Polynukleotid gemäß SEQ ID No. 1 oder eines daraus hergestellten Fragments.

Unter „Polypeptiden“ versteht man Peptide oder Proteine, die zwei oder mehr über Peptidbindungen verbundene Aminosäuren enthalten.

Die Polypeptide gemäß Erfindung schließen ein Polypeptid gemäß SEQ ID No. 2, insbesondere solche mit der biologischen Aktivität des CcpA1-Proteins und auch solche ein, die zu wenigstens 70%, bevorzugt zu wenigstens 80% und besonders zu wenigstens 90% bis 95% identisch sind mit dem Polypeptid gemäß SEQ ID No. 2 und die genannte Aktivität aufweisen.

Die Erfindung betrifft weiterhin ein Verfahren zur fermentativen Herstellung von Aminosäuren, insbesondere L-Lysin, unter Verwendung von coryneformen Bakterien, die insbesondere bereits Aminosäuren produzieren und in denen die für das ccpA1-Gen kodierenden Nukleotidsequenzen abgeschwächt, insbesondere ausgeschaltet oder auf niedrigem Niveau exprimiert werden.

Der Begriff „Abschwächung“ beschreibt in diesem Zusammenhang die Verringerung oder Ausschaltung der intrazellulären Aktivität eines oder mehrerer Enzyme (Proteine) in einem Mikroorganismus, die durch die entsprechende DNA kodiert werden, indem man beispielsweise einen schwachen Promotor verwendet oder ein Gen bzw. Allel verwendet, das für ein entsprechendes Enzym mit einer niedrigen Aktivität kodiert bzw. das entsprechende Gen oder Enzym (Protein) inaktiviert und gegebenenfalls diese Maßnahmen kombiniert.

Der Begriff "Verstärkung" beschreibt in diesem Zusammenhang die Erhöhung der intrazellulären Aktivität eines oder mehrerer Enzyme in einem Mikroorganismus, die durch die entsprechende DNA kodiert werden, indem man beispielsweise 5 die Kopienzahl des Gens bzw. der Gene erhöht, einen starken Promotor verwendet oder ein Gen verwendet, das für ein entsprechendes Enzym mit einer hohen Aktivität kodiert und gegebenenfalls diese Maßnahmen kombiniert.

Die Mikroorganismen, die Gegenstand der vorliegenden 10 Erfindung sind, können Aminosäuren, insbesondere L-Lysin aus Glucose, Saccharose, Lactose, Fructose, Maltose, Melasse, Stärke, Cellulose oder aus Glycerin und Ethanol herstellen. Es kann sich um Vertreter coryneformer Bakterien insbesondere der Gattung *Corynebacterium* handeln. 15 Bei der Gattung *Corynebacterium* ist insbesondere die Art *Corynebacterium glutamicum* zu nennen, die in der Fachwelt für ihre Fähigkeit bekannt ist, L-Aminosäuren zu produzieren.

Geeignete Stämme der Gattung *Corynebacterium*, insbesondere 20 der Art *Corynebacterium glutamicum* (*C. glutamicum*), sind besonders die bekannten Wildtypstämme

*Corynebacterium glutamicum* ATCC13032  
*Corynebacterium acetoglutamicum* ATCC15806  
*Corynebacterium acetoacidophilum* ATCC13870  
25       *Corynebacterium melassecola* ATCC17965  
*Corynebacterium thermoaminogenes* FERM BP-1539  
*Brevibacterium flavum* ATCC14067  
*Brevibacterium lactofermentum* ATCC13869 und  
            *Brevibacterium divaricatum* ATCC14020  
  
30       oder daraus hergestellte L-Aminosäuren produzierende Mutanten beziehungsweise Stämme, wie beispielsweise die L-Lysin produzierenden Stämme

Corynebacterium glutamicum FERM-P 1709  
Brevibacterium flavum FERM-P 1708  
Brevibacterium lactofermentum FERM-P 1712  
Corynebacterium glutamicum FERM-P 6463  
5 Corynebacterium glutamicum FERM-P 6464  
Corynebacterium glutamicum DM58-1  
Corynebacterium glutamicum DG52-5  
Corynebacterium glutamicum DSM 5715 und  
Corynebacterium glutamicum DSM 12866

10 Den Erfindern gelang es, das neue, für das CcpA1-Protein kodierende ccpA1-Gen von *C. glutamicum*, welches ein Katabolit-Kontroll-Protein A ist, zu isolieren.

Zur Isolierung des ccpA1-Gens oder auch anderer Gene von *C. glutamicum* wird zunächst eine Genbank dieses

15 Mikroorganismus in *Escherichia coli* (*E. coli*) angelegt. Das Anlegen von Genbanken ist in allgemein bekannten Lehrbüchern und Handbüchern niedergeschrieben. Als Beispiel seien das Lehrbuch von Winnacker: Gene und Klone, Eine Einführung in die Gentechnologie (Verlag Chemie,

20 Weinheim, Deutschland, 1990), oder das Handbuch von Sambrook et al.: Molecular Cloning, A Laboratory Manual (Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989) genannt. Eine sehr bekannte Genbank ist die des *E. coli* K-12 Stammes W3110, die von Kohara et al. (Cell 50, 495-508 (1987)) in

25 λ-Vektoren angelegt wurde. Bathe et al. (Molecular and General Genetics, 252:255-265, 1996) beschreiben eine Genbank von *C. glutamicum* ATCC13032, die mit Hilfe des Cosmidvektors SuperCos I (Wahl et al., 1987, Proceedings of the National Academy of Sciences USA, 84:2160-2164) im *E.*

30 *coli* K-12 Stamm NM554 (Raleigh et al., 1988, Nucleic Acids Research 16:1563-1575) angelegt wurde. Börmann et al. (Molecular Microbiology 6(3), 317-326 (1992)) wiederum beschreiben eine Genbank von *C. glutamicum* ATCC13032 unter Verwendung des Cosmides pHc79 (Hohn und Collins, 1980, Gene 35 11, 291-298).

Zur Herstellung einer Genbank von *C. glutamicum* in *E. coli* können auch Plasmide wie pBR322 (Bolivar, 1979, Life Sciences, 25, 807-818) oder pUC9 (Vieira et al., 1982, Gene, 19:259-268) verwendet werden. Als Wirsche eignen sich  
5 besonders solche *E. coli*-Stämme, die restriktions- und rekombinationsdefekt sind wie beispielsweise der Stamm DH5 $\alpha$  (Jeffrey H. Miller: „A Short Course in Bacterial Genetics, A Laboratory Manual and Handbook for Escherichia coli and Related Bacteria“, Cold Spring Harbour Laboratory Press, 1992).  
10

Die mit Hilfe von Cosmiden oder anderen  $\lambda$ -Vektoren klonierten langen DNA-Fragmente können anschließend wiederum in gängige für die DNA-Sequenzierung geeignete Vektoren subkloniert werden.

15 Methoden zur DNA-Sequenzierung sind unter anderem bei Sanger et al. (Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America USA, 74:5463-5467, 1977) beschrieben.

20 Die erhaltenen DNA-Sequenzen können dann mit bekannten Algorithmen bzw. Sequenzanalyse-Programmen wie z.B. dem von Staden (Nucleic Acids Research 14, 217-232 (1986)), dem von Marck (Nucleic Acids Research 16, 1829-1836 (1988)) oder dem GCG-Programm von Butler (Methods of Biochemical Analysis 39, 74-97 (1998)) untersucht werden.

25 Auf diese Weise wurde die neue für das ccpA1-Gen kodierende DNA-Sequenz von *C. glutamicum* erhalten, die als SEQ ID No. 1 Bestandteil der vorliegenden Erfindung ist. Weiterhin wurde aus der vorliegenden DNA-Sequenz mit den oben beschriebenen Methoden die Aminosäuresequenz des  
30 entsprechenden Proteins abgeleitet. In SEQ ID No. 2 ist die sich ergebende Aminosäuresequenz des ccpA1-Genproduktes dargestellt.

Kodierende DNA-Sequenzen, die sich aus SEQ ID No. 1 durch die Degeneriertheit des genetischen Kodes ergeben, sind ebenfalls Bestandteil der Erfindung. In gleicher Weise sind DNA-Sequenzen, die mit SEQ ID No. 1 oder Teilen von  
5 SEQ ID No. 1 hybridisieren, Bestandteil der Erfindung. In der Fachwelt sind weiterhin konservative Aminosäureaustausche wie z.B. Austausch von Glycin gegen Alanin oder von Asparaginsäure gegen Glutaminsäure in Proteinen als „Sinnmutationen“ („sense mutations“) bekannt,  
10 die zu keiner grundsätzlichen Veränderung der Aktivität des Proteins führen, d.h. funktionsneutral sind. Weiterhin ist bekannt, daß Änderungen am N- und/oder C-Terminus eines Proteins dessen Funktion nicht wesentlich beeinträchtigen oder sogar stabilisieren können. Angaben hierzu findet der  
15 Fachmann unter anderem bei Ben-Bassat et al. (Journal of Bacteriology 169:751-757 (1987)), bei O'Regan et al. (Gene 77:237-251 (1989)), bei Sahin-Toth et al. (Protein Sciences 3:240-247 (1994)), bei Hochuli et al. (Bio/Technology 6:1321-1325 (1988)) und in bekannten Lehrbüchern der  
20 Genetik und Molekularbiologie. Aminosäuresequenzen, die sich in entsprechender Weise aus SEQ ID No. 2 ergeben, sind ebenfalls Bestandteil der Erfindung.

Schließlich sind DNA-Sequenzen Bestandteil der Erfindung, die durch die Polymerase-Kettenreaktion (PCR) unter  
25 Verwendung von Primern hergestellt werden, die sich aus SEQ ID No. 1 ergeben. Derartige Oligonukleotide haben typischerweise eine Länge von mindestens 15 Nukleotiden.

Anleitungen zur Identifizierung von DNA-Sequenzen mittels Hybridisierung findet der Fachmann unter anderem im  
30 Handbuch "The DIG System Users Guide for Filter Hybridization" der Firma Boehringer Mannheim GmbH (Mannheim, Deutschland, 1993) und bei Liebl et al. (International Journal of Systematic Bacteriology 41: 255-260 (1991)). Die Hybridisierung findet unter stringenten  
35 Bedingungen statt, das heisst, es werden nur Hybride

gebildet, bei denen Sonde und Zielsequenz, d.h. die mit der Sonde behandelten Polynukleotide, mindestens 70% identisch sind. Es ist bekannt, dass die Stringenz der Hybridisierung einschließlich der Waschschrifte durch

5 Variieren der Pufferzusammensetzung, der Temperatur und der Salzkonzentration beeinflusst bzw. bestimmt wird. Die Hybridisierungsreaktion wird vorzugsweise bei relativ niedriger Stringenz im Vergleich zu den Waschschriften durchgeführt (Hybaid Hybridisation Guide, Hybaid Limited,

10 Teddington, UK, 1996).

Für die Hybridisierungsreaktion kann beispielsweise ein 5x SSC-Puffer bei einer Temperatur von ca. 50 - 68°C eingesetzt werden. Dabei können Sonden auch mit Polynukleotiden hybridisieren, die weniger als 70%

15 Identität zur Sequenz der Sonde aufweisen. Solche Hybride sind weniger stabil und werden durch Waschen unter stringenten Bedingungen entfernt. Dies kann beispielsweise durch Senken der Salzkonzentration auf 2x SSC und nachfolgend 0,5x SSC (The DIG System User's Guide for

20 Filter Hybridisation, Boehringer Mannheim, Mannheim, Deutschland, 1995) erreicht werden, wobei eine Temperatur von ca. 50 - 68°C eingestellt wird. Es ist gegebenenfalls möglich die Salzkonzentration bis auf 0,1x SSC zu senken. Durch schrittweise Erhöhung der Hybridisierungstemperatur in Schritten von ca. 1 - 2°C können Polynukleotidfragmente isoliert werden, die beispielsweise mindestens 70% oder mindestens 80% oder mindestens 90% bis 95% Identität zur Sequenz der eingesetzten Sonde besitzen. Weitere Anleitungen zur Hybridisierung sind in Form sogenannter

25 Kits am Markt erhältlich (z.B. DIG Easy Hyb von der Firma Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Deutschland, Catalog No.

30 1603558).

Anleitungen zur Amplifikation von DNA-Sequenzen mit Hilfe der Polymerase-Kettenreaktion (PCR) findet der Fachmann

35 unter anderem im Handbuch von Gait: Oligonucleotide

Synthesis: A Practical Approach (IRL Press, Oxford, UK, 1984) und bei Newton und Graham: PCR (Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg, Deutschland, 1994).

Bei der Arbeit an der vorliegenden Erfindung konnte  
5 festgestellt werden, daß coryneforme Bakterien nach Abschwächung des ccpA1-Gens in verbesserter Weise Aminosäuren, insbesondere L-Lysin, produzieren.

Zur Erzielung einer Abschwächung können entweder die Expression des ccpA1-Gens oder die katalytischen  
10 Eigenschaften des Enzymproteins herabgesetzt oder ausgeschaltet werden. Gegebenenfalls können beide Maßnahmen kombiniert werden.

Die Verringerung der Genexpression kann durch geeignete Kulturführung oder durch genetische Veränderung (Mutation)  
15 der Signalstrukturen der Genexpression erfolgen.

Signalstrukturen der Genexpression sind beispielsweise Repressorgene, Aktivatorgene, Operatoren, Promotoren, Attenuatoren, Ribosomenbindungsstellen, das Startkodon und Terminatoren. Angaben hierzu findet der Fachmann z.B. in  
20 der Patentanmeldung WO 96/15246, bei Boyd und Murphy (Journal of Bacteriology 170: 5949 (1988)), bei Voskuil und Chambliss (Nucleic Acids Research 26: 3548 (1998)), bei Jensen und Hammer (Biotechnology and Bioengineering 58: 191 (1998)), bei Pátek et al. (Microbiology 142: 1297 (1996)),  
25 Vasicova et al. (Journal of Bacteriology 181: 6188 (1999)) und in bekannten Lehrbüchern der Genetik und Molekularbiologie wie z.B. dem Lehrbuch von Knippers („Molekulare Genetik“, 6. Auflage, Georg Thieme Verlag, Stuttgart, Deutschland, 1995) oder dem von Winnacker („Gene und Klone“, VCH Verlagsgesellschaft, Weinheim, Deutschland, 30 1990).

Mutationen, die zu einer Veränderung bzw. Herabsetzung der katalytischen Eigenschaften von Enzymproteinen führen, sind aus dem Stand der Technik bekannt; als Beispiele seien die

Arbeiten von Qiu und Goodman (Journal of Biological Chemistry 272: 8611-8617 (1997)), Sugimoto et al. (Bioscience Biotechnology and Biochemistry 61: 1760-1762 (1997)) und Möckel („Die Threonindehydrolase aus 5 Corynebacterium glutamicum: Aufhebung der allosterischen Regulation und Struktur des Enzyms“, Berichte des Forschungszentrums Jülichs, Jül-2906, ISSN09442952, Jülich, Deutschland, 1994) genannt. Zusammenfassende Darstellungen können bekannten Lehrbüchern der Genetik und 10 Molekularbiologie wie z.B. dem von Hagemann („Allgemeine Genetik“, Gustav Fischer Verlag, Stuttgart, 1986) entnommen werden.

Als Mutationen kommen Transitionen, Transversionen, Insertionen und Deletionen in Betracht. In Abhängigkeit 15 von der Wirkung des Aminosäureaustausches auf die Enzymaktivität wird von Fehlsinnmutationen („missense mutations“) oder Nichtsinnmutationen („nonsense mutations“) gesprochen. Insertionen oder Deletionen von mindestens einem Basenpaar (bp) in einem Gen führen zu 20 Rasterverschiebungsmutationen („frame shift mutations“), in deren Folge falsche Aminosäuren eingebaut werden oder die Translation vorzeitig abbricht. Deletionen von mehreren Kodonen führen typischerweise zu einem vollständigen Ausfall der Enzymaktivität. Anleitungen zur Erzeugung 25 derartiger Mutationen gehören zum Stand der Technik und können bekannten Lehrbüchern der Genetik und Molekularbiologie wie z.B. dem Lehrbuch von Knippers („Molekulare Genetik“, 6. Auflage, Georg Thieme Verlag, Stuttgart, Deutschland, 1995), dem von Winnacker („Gene und Klone“, VCH Verlagsgesellschaft, Weinheim, Deutschland, 30 1990) oder dem von Hagemann („Allgemeine Genetik“, Gustav Fischer Verlag, Stuttgart, 1986) entnommen werden.

Eine gebräuchliche Methode, Gene von C. glutamicum zu 35 mutieren, ist die von Schwarzer und Pühler (Bio/Technology 9, 84-87 (1991)) beschriebene Methode der Gen-Unterbrechung

(„gene disruption“) und des Gen-Austauschs („gene replacement“).

Bei der Methode der Gen-Unterbrechung wird ein zentraler Teil der Kodierregion des interessierenden Gens in einen Plasmidvektor kloniert, der in einem Wirt (typischerweise *E. coli*), nicht aber in *C. glutamicum* replizieren kann.

Als Vektoren kommen beispielsweise pSUP301 (Simon et al., Bio/Technology 1, 784-791 (1983)), pK18mob oder pK19mob (Schäfer et al., Gene 145, 69-73 (1994)), pK18mobsacB oder pK19mobsacB (Jäger et al., Journal of Bacteriology 174: 5462-65 (1992)), pGEM-T (Promega corporation, Madison, WI, USA), pCR2.1-TOPO (Shuman (1994)). Journal of Biological Chemistry 269:32678-84; US-Patent 5,487,993), pCR®Blunt (Firma Invitrogen, Groningen, Niederlande; Bernard et al., Journal of Molecular Biology, 234: 534-541 (1993)) oder pEM1 (Schrumpf et al, 1991, Journal of Bacteriology 173:4510-4516) in Frage. Der Plasmidvektor, der das zentrale Teil der Kodierregion des Gens enthält, wird anschließend durch Konjugation oder Transformation in den gewünschten Stamm von *C. glutamicum* überführt. Die Methode der Konjugation ist beispielsweise bei Schäfer et al. (Applied and Environmental Microbiology 60, 756-759 (1994)) beschrieben. Methoden zur Transformation sind beispielsweise bei Thierbach et al. (Applied Microbiology and Biotechnology 29, 356-362 (1988)), Dunican und Shivnan (Bio/Technology 7, 1067-1070 (1989)) und Tauch et al. (FEMS Microbiological Letters 123, 343-347 (1994)) beschrieben. Nach homologer Rekombination mittels eines "cross-over"- Ereignisses wird die Kodierregion des betreffenden Gens durch die Vektorsequenz unterbrochen und man erhält zwei unvollständige Allele, denen jeweils das 3'- bzw. das 5'- Ende fehlt. Diese Methode wurde beispielsweise von Fitzpatrick et al. (Applied Microbiology and Biotechnology 42, 575-580 (1994)) zur Ausschaltung des recA-Gens von *C. glutamicum* verwendet.

Bei der Methode des Genaustausches („gene replacement“) wird eine Mutation wie z.B. eine Deletion, Insertion oder Basenaustausch in dem interessierenden Gen in-vitro hergestellt. Das hergestellte Allel wird wiederum in einen für C. glutamicum nicht replikativen Vektor kloniert und dieser anschließend durch Transformation oder Konjugation in den gewünschten Wirt von C. glutamicum überführt. Nach homologer Rekombination mittels eines ersten, Integration bewirkenden „cross-over“-Ereignisses und eines geeigneten zweiten, eine Exzision bewirkenden „cross-over“-Ereignisses im Zielgen bzw. in der Zielsequenz erreicht man den Einbau der Mutation bzw. des Allels. Diese Methode wurde beispielsweise von Peters-Wendisch et al. (Microbiology 144, 915 – 927 (1998)) verwendet, um das pyc-Gen von C. glutamicum durch eine Deletion auszuschalten.

In das ccpA1-Gen kann auf diese Weise eine Deletion, Insertion oder ein Basenaustausch eingebaut werden.

Zusätzlich kann es für die Produktion von L-Aminosäuren, insbesondere L-Lysin, vorteilhaft sein, zusätzlich zur Abschwächung des ccpA1-Gens eines oder mehrere Enzyme des jeweiligen Biosyntheseweges, der Glykolyse, der Anaplerotik, des Zitronensäure-Zyklus, des Pentosephosphatzzyklus oder des Aminosäure-Exports und gegebenenfalls regulatorische Proteine zu verstärken, insbesondere überzuexprimieren.

Der Begriff "Verstärkung" beschreibt in diesem Zusammenhang die Erhöhung der intrazellulären Aktivität eines oder mehrerer Enzyme (Proteine) in einem Mikroorganismus, die durch die entsprechende DNA kodiert werden, indem man beispielsweise die Kopienzahl des Gens bzw. der Gene erhöht, einen starken Promotor verwendet oder ein Gen oder Allel verwendet, das für ein entsprechendes Enzym (Protein) mit einer hohen Aktivität kodiert und gegebenenfalls diese Maßnahmen kombiniert.

So kann beispielsweise für die Herstellung von L-Lysin gleichzeitig eines oder mehrere der Gene, ausgewählt aus der Gruppe

- das für die Dihydridipicolinat-Synthase kodierende Gen dapA (EP-B 0 197 335),
- das für die Enolase kodierende Gen eno (DE: 19947791.4),
- das für das zwf-Genprodukt kodierende Gen zwf (JP-A-09224661),
- gleichzeitig das für die Tetrahydrodipicolinat Succinylase kodierende dapD Gen (Wehrmann et al., Journal of Bacteriology 180, 3159-3165 (1998)),
- gleichzeitig das Gen für die Succinyldiaminopimelate-Desuccinylase kodierende dapE Gen (Wehrmann et al., Journal of Bacteriology 177: 5991-5993 (1995)),
- 15 • gleichzeitig das für die Glyceraldehyd-3-Phosphat Dehydrogenase kodierende gap-Gen (Eikmanns (1992). Journal of Bacteriology 174:6076-6086),
- das für die Pyruvat Carboxylase kodierende Gen pyc (Peters-Wendisch et al. (Microbiology 144, 915 - 927 (1998))
- 20 • gleichzeitig das für die Malat:Chinon Oxidoreduktase kodierende mgo-Gen (Molenaar et al., European Journal of Biochemistry 254, 395 - 403 (1998)),
- das für eine feed back resistente Aspartatkinaise kodierende Gen lysC (Kalinowski et al. (1990), Molecular and General Genetics 224, 317-324; Accession No.P26512; EP-B-0387527; EP-A-0699759; WO 00/63388),
- 25 • das für das Zwal-Protein kodierende Gen zwal (DE: 19959328.0, DSM 13115),

- das für den Lysin-Export kodierende Gen lysE (DE-A-195 48 222)

verstärkt, insbesondere überexprimiert werden.

Außerdem kann es für die Produktion von Aminosäuren,

5 insbesondere L-Lysin, vorteilhaft sein, neben der Abschwächung des ccpA1-Gens gleichzeitig eines oder mehrere der Gene, ausgewählt aus der Gruppe

- das für die Phosphoenolpyruvat-Carboxykinase kodierende Gen pck (DE 199 50 409.1, DSM 13047),

10 • das für die Glucose-6-Phosphat Isomerase kodierende Gen pgi (US 09/396,478, DSM 12969),

- das für das Zwa2-Protein kodierende Gen zwa2 (DE: 19959327.2, DSM 13113),

- das für die Pyruvat-Oxidase kodierende Gen poxB  
15 DE:1995 1975.7, DSM 13114)

abzuschwächen.

Weiterhin kann es für die Produktion von Aminosäuren, insbesondere L-Lysin vorteilhaft sein, neben der

20 Abschwächung des ccpA1-Gens unerwünschte Nebenreaktionen auszuschalten (Nakayama: „Breeding of Amino Acid Producing Microorganisms“, in: Overproduction of Microbial Products, Krumphanzl, Sikyta, Vanek (eds.), Academic Press, London, UK, 1982).

Die erfindungsgemäß hergestellten Mikroorganismen sind

25 ebenfalls Gegenstand der Erfindung und können kontinuierlich oder diskontinuierlich im batch - Verfahren (Satzkultivierung) oder im fed batch (Zulaufverfahren) oder repeated fed batch Verfahren (repetitives Zulaufverfahren) zum Zwecke der Produktion von L-Aminosäuren, insbesondere L-Lysin kultiviert werden. Eine Zusammenfassung über

bekannte Kultivierungsmethoden sind im Lehrbuch von Chmiel (Bioprozesstechnik 1. Einführung in die Bioverfahrenstechnik (Gustav Fischer Verlag, Stuttgart, 1991)) oder im Lehrbuch von Storhas (Bioreaktoren und 5 periphere Einrichtungen (Vieweg Verlag, Braunschweig/Wiesbaden, 1994)) beschrieben.

Das zu verwendende Kulturmedium muß in geeigneter Weise den Ansprüchen der jeweiligen Stämme genügen. Beschreibungen von Kulturmedien verschiedener Mikroorganismen sind im 10 Handbuch „Manual of Methods for General Bacteriology,“ der American Society for Bacteriology (Washington D.C., USA, 1981) enthalten. Als Kohlenstoffquelle können Zucker und Kohlehydrate wie z.B. Glucose, Saccharose, Lactose, Fructose, Maltose, Melasse, Stärke und Cellulose, Öle und 15 Fette, wie zum Beispiel Sojaöl, Sonnenblumenöl, Erdnußöl und Kokosfett, Fettsäuren, wie zum Beispiel Palmitinsäure, Stearinsäure und Linolsäure, Alkohole wie zum Beispiel Glycerin und Ethanol und organische Säuren, wie zum Beispiel Essigsäure verwendet werden. Diese Stoffe können 20 einzeln oder als Mischung verwendet werden.

Als Stickstoffquelle können organische Stickstoff-haltige Verbindungen wie Peptone, Hefeextrakt, Fleischextrakt, Malzextrakt, Maisquellwasser, Sojabohnenmehl und Harnstoff oder anorganische Verbindungen wie Ammoniumsulfat, 25 Ammoniumchlorid, Ammoniumphosphat, Ammoniumcarbonat und Ammoniumnitrat verwendet werden. Die Stickstoffquellen können einzeln oder als Mischung verwendet werden.

Als Phosphorquelle können Phosphorsäure, Kaliumdihydrogenphosphat oder Dikaliumhydrogenphosphat oder 30 die entsprechenden Natrium-haltigen Salze verwendet werden. Das Kulturmedium muß weiterhin Salze von Metallen enthalten, wie zum Beispiel Magnesiumsulfat oder Eisensulfat, die für das Wachstum notwendig sind. Schließlich können essentielle Wuchsstoffe wie Aminosäuren 35 und Vitamine zusätzlich zu den oben genannten Stoffen

eingesetzt werden. Dem Kulturmedium können überdies geeignete Vorstufen zugesetzt werden. Die genannten Einsatzstoffe können zur Kultur in Form eines einmaligen Ansatzes hinzugegeben oder in geeigneter Weise während der 5 Kultivierung zugefüttert werden.

Zur pH - Kontrolle der Kultur werden basische Verbindungen wie Natriumhydroxid, Kaliumhydroxid, Ammoniak beziehungsweise Ammoniakwasser oder saure Verbindungen wie Phosphorsäure oder Schwefelsäure in geeigneter Weise 10 eingesetzt. Zur Kontrolle der Schaumentwicklung können Antischaummittel, wie zum Beispiel Fettsäurepolyglykolester eingesetzt werden. Zur Aufrechterhaltung der Stabilität von Plasmiden können dem Medium geeignete selektiv wirkende Stoffe, wie zum Beispiel Antibiotika hinzugefügt werden. 15 Um aerobe Bedingungen aufrechtzuerhalten, werden Sauerstoff oder Sauerstoff-haltige Gasmischungen, wie zum Beispiel Luft in die Kultur eingetragen. Die Temperatur der Kultur liegt normalerweise bei 20°C bis 45°C und vorzugsweise bei 25°C bis 40°C. Die Kultur wird solange fortgesetzt, bis 20 sich ein Maximum des gewünschten Produktes gebildet hat. Dieses Ziel wird normalerweise innerhalb von 10 Stunden bis 160 Stunden erreicht.

Methoden zur Bestimmung von L-Aminosäuren sind aus dem Stand der Technik bekannt. Die Analyse kann zum Beispiel 25 so wie bei Spackman et al. (Analytical Chemistry, 30, (1958), 1190) beschrieben durch Anionenaustausch-Chromatographie mit anschließender Ninhydrin-Derivatisierung erfolgen, oder sie kann durch reversed phase HPLC erfolgen, so wie bei Lindroth et al. (Analytical 30 Chemistry (1979) 51: 1167-1174) beschrieben.

Das erfindungsgemäße Verfahren dient zur fermentativen Herstellung von Aminosäuren, insbesondere L-Lysin.

Folgender Mikroorganismus wurde am 23.08.2000 als Reinkultur bei der Deutschen Sammlung für Mikrorganismen

und Zellkulturen (DSMZ, Braunschweig, Deutschland) gemäß Budapest Vertrag hinterlegt:

- Escherichia coli Stamm Top10F/pCR2.1ccpA1int DSM 13636.

Die vorliegende Erfindung wird im folgenden anhand von

5 Ausführungsbeispielen näher erläutert.

Die Isolierung von Plasmid-DNA aus Escherichia coli sowie alle Techniken zur Restriktion, Klenow- und alkalische Phosphatasebehandlung wurden nach Sambrook et al.

(Molecular Cloning. A Laboratory Manual, 1989, Cold Spring

10 Harbour Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, USA) durchgeführt. Methoden zur Transformation von Escherichia coli sind ebenfalls in diesem Handbuch beschrieben.

Die Zusammensetzung gängiger Nährmedien wie LB- oder TY-Medium kann ebenfalls dem Handbuch von Sambrook et al.

15 entnommen werden.

### Beispiel 1

Herstellung einer genomischen Cosmid-Genbank aus C. glutamicum ATCC 13032

Chromosomale DNA aus C. glutamicum ATCC 13032 wurde wie bei

20 Tauch et al., (1995, Plasmid 33:168-179) beschrieben, isoliert und mit dem Restriktionsenzym Sau3AI (Amersham Pharmacia, Freiburg, Deutschland, Produktbeschreibung Sau3AI, Code no. 27-0913-02) partiell gespalten. Die DNA-Fragmente wurden mit shrimp alkalischer Phosphatase (Roche Molecular Biochemicals, Mannheim, Deutschland, Produktbeschreibung SAP, Code no. 1758250) dephosphoryliert. Die DNA des Cosmid-Vektors SuperCos1 (Wahl et al. (1987), Proceedings of the National Academy of Sciences, USA 84:2160-2164), bezogen von der Firma 25 Stratagene (La Jolla, USA, Produktbeschreibung SuperCos1 Cosmid Vektor Kit, Code no. 251301) wurde mit dem Restriktionsenzym XbaI (Amersham Pharmacia, Freiburg,

Deutschland, Produktbeschreibung XbaI, Code no. 27-0948-02) gespalten und ebenfalls mit shrimp alkalischer Phosphatase dephosphoryliert.

- Anschließend wurde die Cosmid-DNA mit dem Restriktionsenzym  
5 BamHI (Amersham Pharmacia, Freiburg, Deutschland, Produktbeschreibung BamHI, Code no. 27-0868-04) gespalten. Die auf diese Weise behandelte Cosmid-DNA wurde mit der behandelten ATCC13032-DNA gemischt und der Ansatz mit T4-DNA-Ligase (Amersham Pharmacia, Freiburg, Deutschland,  
10 Produktbeschreibung T4-DNA-Ligase, Code no. 27-0870-04) behandelt. Das Ligationsgemisch wurde anschließend mit Hilfe des Gigapack II XL Packing Extracts (Stratagene, La Jolla, USA, Produktbeschreibung Gigapack II XL Packing Extract, Code no. 200217) in Phagen verpackt.
- 15 Zur Infektion des E. coli Stammes NM554 (Raleigh et al. 1988, Nucleic Acid Res. 16:1563-1575) wurden die Zellen in 10 mM MgSO<sub>4</sub> aufgenommen und mit einem Aliquot der Phagensuspension vermischt. Infektion und Titerung der Cosmidbank wurden wie bei Sambrook et al. (1989, Molecular  
20 Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor) beschrieben durchgeführt, wobei die Zellen auf LB-Agar (Lennox, 1955, Virology, 1:190) + 100 µg/ml Ampicillin ausplattiert wurden. Nach Inkubation über Nacht bei 37°C wurden rekombinante Einzelklone selektioniert.

25 Beispiel 2

Isolierung und Sequenzierung des Gens ccpA1

- Die Cosmid-DNA einer Einzelkolonie wurde mit dem Qiaprep Spin Miniprep Kit (Product No. 27106, Qiagen, Hilden, Germany) nach Herstellerangaben isoliert und mit dem  
30 Restriktionsenzym Sau3AI (Amersham Pharmacia, Freiburg, Deutschland, Produktbeschreibung Sau3AI, Product No. 27-0913-02) partiell gespalten. Die DNA-Fragmente wurden mit shrimp alkalischer Phosphatase (Roche Molecular

Biochemicals, Mannheim, Deutschland, Produktbeschreibung SAP, Product No. 1758250) dephosphoryliert. Nach gelelektrophoretischer Auftrennung erfolgte die Isolierung der Cosmidfragmente im Größenbereich von 1500 bis 2000 bp  
5 mit dem QiaExII Gel Extraction Kit (Product No. 20021, Qiagen, Hilden, Germany).

Die DNA des Sequenzervektors pZero-1 bezogen von der Firma Invitrogen (Groningen, Niederlande, Produktbeschreibung Zero Background Cloning Kit, Product No. K2500-01) wurde  
10 mit dem Restriktionsenzym BamHI (Amersham Pharmacia, Freiburg, Deutschland, Produktbeschreibung BamHI, Product No. 27-0868-04) gespalten. Die Ligation der Cosmidfragmente in den Sequenzervektor pZero-1 wurde wie von Sambrook et al. (1989, Molecular Cloning: A Laboratory  
15 Manual, Cold Spring Harbor) beschrieben durchgeführt, wobei das DNA-Gemisch mit T4-Ligase (Pharmacia Biotech, Freiburg, Deutschland) über Nacht inkubiert wurde. Dieses Ligationsgemisch wurde anschließend in den E. coli Stamm DH5 $\alpha$ MCR (Grant, 1990, Proceedings of the National Academy  
20 of Sciences, U.S.A., 87:4645-4649) elektroporiert (Tauch et al. 1994, FEMS Microbiol Letters, 123:343-7) und auf LB-Agar (Lennox, 1955, Virology, 1:190) mit 50  $\mu$ g/ml Zeocin ausplattiert.

25 Die Plasmidpräparation der rekombinanten Klone erfolgte mit dem Biorobot 9600 (Product No. 900200, Qiagen, Hilden, Deutschland). Die Sequenzierung erfolgte nach der Dideoxy-Kettenabbruch-Methode von Sanger et al. (1977, Proceedings of the National Academies of Sciences, U.S.A., 74:5463-5467) mit Modifikationen nach Zimmermann et al. (1990,  
30 Nucleic Acids Research, 18:1067). Es wurde der "RR dRhodamin Terminator Cycle Sequencing Kit" von PE Applied Biosystems (Product No. 403044, Weiterstadt, Deutschland) verwendet. Die gelelektrophoretische Auftrennung und Analyse der Sequenzierreaktion erfolgte in einem  
35 "Rotiphorese NF Acrylamid/Bisacrylamid" Gel (29:1) (Product

No. A124.1, Roth, Karlsruhe, Germany) mit dem "ABI Prism 377" Sequenziergerät von PE Applied Biosystems (Weiterstadt, Deutschland).

Die erhaltenen Roh-Sequenzdaten wurden anschließend unter  
5 Anwendung des Staden-Programmpakets (1986, Nucleic Acids Research, 14:217-231) Version 97-0 prozessiert. Die Einzelsequenzen der pZerol-Derivate wurden zu einem zusammenhängenden Contig assembled. Die computergestützte Kodierbereichsanalyse wurde mit dem  
10 Programm XNIP (Staden, 1986, Nucleic Acids Research, 14:217-231) angefertigt. Weitere Analysen wurden mit den "BLAST search programs" (Altschul et al., 1997, Nucleic Acids Research, 25:33893402) gegen die non-redundant Datenbank des "National Center for Biotechnology  
15 Information" (NCBI, Bethesda, MD, USA) durchgeführt.

Die erhaltene Nukleotidsequenz ist in SEQ ID No. 1 dargestellt. Die Analyse der Nukleotidsequenz ergab ein offenes Leseraster von 1167 bp, welches als ccpA1-Gen bezeichnet wurde. Das ccpA1-Gen kodiert für ein Polypeptid  
20 von 388 Aminosäuren.

### Beispiel 3

#### Herstellung eines Integrationsvektors für die Integrationsmutagenese des ccpA1-Gens

Aus dem Stamm ATCC 13032 wurde nach der Methode von  
25 Eikmanns et al. (Microbiology 140: 1817 - 1828 (1994)) chromosomal DNA isoliert. Aufgrund der aus Beispiel 2 für C. glutamicum bekannten Sequenz des ccpA1-Gens wurden die folgenden Oligonukleotide für die Polymerase-Kettenreaktion ausgewählt (siehe SEQ ID No. 3 und SEQ ID No. 4):

30 ccpA1intA:  
5`AGA GCT GCT TGG TCA GAC TT 3`  
ccpA1intB:  
5`ATC CAG ATT CTT GGC GGT AG 3`

Die dargestellten Primer wurden von der Firma MWG Biotech (Ebersberg, Deutschland) synthetisiert und nach der Standard-PCR-Methode von Innis et al. (PCR protocols. A guide to methods and applications, 1990, Academic Press)

5 mit Pwo-Polymerase der Firma Boehringer die PCR Reaktion durchgeführt. Mit Hilfe der Polymerase-Kettenreaktion wurde ein 362 bp großes internes Fragment des ccpA1-Gens isoliert.

Das amplifizierte DNA Fragment wurde mit dem TOPO TA  
10 Cloning Kit der Firma Invitrogen Corporation (Carlsbad, CA, USA; Katalog Nummer K4500-01) in den Vektor pCR2.1-TOPO (Mead et al. (1991), Bio/Technology 9:657-663) ligiert.

Anschließend wurde der E. coli Stamm TOP10F mit dem  
Ligationsansatz (Hanahan, In: DNA cloning. A practical  
15 approach. Vol. I, IRL-Press, Oxford, Washington DC, USA 1985) transformiert. Die Selektion von Plasmid-tragenden Zellen erfolgte durch Ausplattieren des Transformationsansatzes auf LB Agar (Sambrook et al., Molecular Cloning: A Laboratory Manual. 2<sup>nd</sup> Ed., Cold  
20 Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y., 1989), der mit 25 mg/l Kanamycin supplementiert worden war. Plasmid-DNA wurde aus einer Transformante mit Hilfe des QIAprep Spin Miniprep Kit der Firma Qiagen isoliert und durch Restriktion mit dem Restriktionsenzym EcoRI und  
25 anschließender Agarosegel-Elektrophorese (0,8%) überprüft. Das Plasmid wurde pCR2.1ccpA1int genannt.

#### Beispiel 4

Integrationsmutagenese des ccpA1-Gens in dem Lysinproduzenten DSM 5715

30 Der in Beispiel 3 genannte Vektor pCR2.1ccpA1int wurde nach der Elektroporationsmethode von Tauch et al. (FEMS Microbiological Letters, 123:343-347 (1994)) in C. glutamicum DSM 5715 elektroporiert. Bei dem Stamm DSM 5715

handelt es sich um einen AEC resistenten Lysin-Produzenten.  
Der Vektor pCR2.1ccpA1int kann in DSM 5715 nicht  
selbständig replizieren und bleibt nur dann in der Zelle  
erhalten, wenn er ins Chromosom von DSM 5715 integriert  
5 hat. Die Selektion von Klonen mit ins Chromosom  
integriertem pCR2.1ccpA1int erfolgte durch Ausplattieren  
des Elektroporationsansatzes auf LB Agar (Sambrook et al.,  
Molecular Cloning: A Laboratory Manual. 2<sup>nd</sup> Ed., Cold  
Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y.),  
10 der mit 15 mg/l Kanamycin supplementiert worden war.

Für den Nachweis der Integration wurde das ccpA1int-  
Fragment nach der Methode "The DIG System Users Guide for  
Filter Hybridization" der Firma Boehringer Mannheim GmbH  
(Mannheim, Deutschland, 1993) mit dem Dig-  
15 Hybridisierungskit der Firma Boehringer markiert.  
Chromosomal DNA eines potentiellen Integranten wurde nach  
der Methode von Eikmanns et al. (Microbiology 140: 1817 -  
1828 (1994)) isoliert und jeweils mit den  
Restriktionsenzymen PstI, SacI und HindIII geschnitten. Die  
20 entstehenden Fragmente wurden mit Agarosegel-Elektrophorese  
aufgetrennt und mit dem Dig-Hybridisierungskit der Firma  
Boehringer bei 68°C hybridisiert. Das in Beispiel 3  
genannte Plasmid pCR2.1ccpA1int hatte innerhalb des  
chromosomalen ccpA1-Gens ins Chromosom von DSM 5715  
25 inseriert. Der Stamm wurde als DSM 5715::pCR2.1ccpA1int  
bezeichnet.

#### Beispiel 5

##### Herstellung von L-Lysin

Der in Beispiel 4 erhaltene C. glutamicum Stamm DSM  
30 5715::pCR2.1ccpA1int wurde in einem zur Produktion von L-  
Lysin geeigneten Nährmedium kultiviert und der L-  
Lysingehalt im Kulturüberstand bestimmt.

Dazu wurde der Stamm zunächst auf Agarplatte mit dem entsprechenden Antibiotikum (Hirn-Herz Agar mit Kanamycin (25 mg/l) für 24 Stunden bei 33°C inkubiert. Ausgehend von dieser Agarplattenkultur wurde eine Vorkultur angeimpft (10 5 ml Medium im 100 ml Erlenmeyerkolben). Als Medium für die Vorkultur wurde das Vollmedium CgIII verwendet.

Medium Cg III

NaCl 2,5 g/l

Bacto-Pepton 10 g/l

Bacto-Yeast-Extrakt 10 g/l

Glucose (getrennt autoklaviert) 2% (w/v)

Der pH-Wert wurde auf pH 7.4 eingestellt

Diesem wurde Kanamycin (25 mg/l) zugesetzt. Die Vorkultur 10 wurde 24 Stunden bei 33°C bei 240 rpm auf dem Schüttler inkubiert. Von dieser Vorkultur wurde eine Hauptkultur angeimpft, so daß die Anfangs-OD (660 nm) der Hauptkultur 0,1 OD betrug. Für die Hauptkultur wurde das Medium MM verwendet.

## Medium MM

CSL (Corn Steep Liquor) 5 g/l

MOPS (Morpholinopropansulfonsäure) 20 g/l

Glucose (getrennt autoklaviert) 50g/l

## Salze:

$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  25 g/l

$\text{KH}_2\text{PO}_4$  0,1 g/l

$\text{MgSO}_4 \cdot 7 \text{ H}_2\text{O}$  1,0 g/l

$\text{CaCl}_2 \cdot 2 \text{ H}_2\text{O}$  10 mg/l

$\text{FeSO}_4 \cdot 7 \text{ H}_2\text{O}$  10 mg/l

$\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$  5,0mg/l

Biotin (sterilfiltriert) 0,3 mg/l

Thiamin \* HCl (sterilfiltriert) 0,2 mg/l

Leucin (sterilfiltriert) 0,1 g/l

$\text{CaCO}_3$  25 g/l

CSL, MOPS und die Salzlösung werden mit Ammoniakwasser auf pH 7 eingestellt und autoklaviert. Anschließend werden die 5 sterilen Substrat- und Vitaminlösungen sowie das trocken autoklavierte  $\text{CaCO}_3$  zugesetzt.

Die Kultivierung erfolgt in 10 ml Volumen in einem 100 ml Erlenmeyerkolben mit Schikanen. Es wurde Kanamycin (25 mg/l) zugesetzt. Die Kultivierung erfolgte bei 33°C und 80% 10 Luftfeuchtigkeit.

Nach 72 Stunden wurde die OD bei einer Meßwellenlänge von 660 nm mit dem Biomek 1000 (Beckmann Instruments GmbH, München) ermittelt. Die gebildete L-Lysinmenge wurde mit einem Aminosäureanalysator der Firma Eppendorf-BioTronik 5 (Hamburg, Deutschland) durch Ionenaustausch-Chromatographie und Nachsäulenderivatisierung mit Ninhydrindetektion bestimmt.

In Tabelle 1 ist das Ergebnis des Versuchs dargestellt.

Tabelle 1

Stamm	OD (660 nm)	Lysin-HCl g/l
DSM 5715	7,5	13,01
DSM 5715::pCR2.1ccpA1int	7,7	14,24

10

#### Beschreibung der Figur

Figur 1: Karte des Plasmids pCR2.1ccpA1int.

Die verwendeten Abkürzungen und Bezeichnungen haben folgende Bedeutung.

- KmR: Kanamycin Resistenz-Gen
- EcoRI: Schnittstelle des Restriktionsenzyms EcoRI
- HindIII: Schnittstelle des Restriktionsenzyms HindIII
- PstI: Schnittstelle des Restriktionsenzyms PstI
- SacI: Schnittstelle des Restriktionsenzyms SacI
- ccpA1int: internes Fragment des ccpA1-Gens
- ColE1 ori: Replikationsursprung des Plasmids ColE1

## SEQUENZPROTOKOLL

<110> Degussa AG

5 <120> Neue für das ccpA1-Gen kodierende Nukleotidsequenzen

<130> 000059 BT

10 <140>

<141>

<160> 4

15 <170> PatentIn Ver. 2.1

<210> 1

<211> 1600

<212> DNA

20 <213> Corynebacterium glutamicum

<220>

<221> CDS

<222> (225)..(1388)

<223> ccpA1-Gen

25 <400> 1

tgggttactg cccaggcaat gtttggatag ttttcgggc ttttatcaac agccaataac 60

30 agctcttcg cccattgagg tggagggct gtttttcat gccgtaagga aagtgcagg 120

aagtgaaatc aagtggccta gatccattga cacttagact gtgacctagg cttgacttcc 180

gtggggaggt ggggataagt tcatcttaaa cacaatgcaa tcga ttg cat tta cgt 236

Met His Leu Arg

1

35

tcc tta tcc cac aat agg ggt acc ttc cag aaa gtt ggt gag gag atg 284  
Ser Leu Ser His Asn Arg Gly Thr Phe Gln Lys Val Gly Glu Glu Met

5

10

15

20

40

gct tcc gaa acc tcc agc ccg aag aag cgcc acc acg ctc aaa gac 332  
Ala Ser Glu Thr Ser Ser Pro Lys Lys Arg Ala Thr Thr Leu Lys Asp

25

30

35

45

atc gcg caa gca aca cag ctt tca gtc agc acg gtg tcc cg gca ttg 380  
Ile Ala Gln Ala Thr Gln Leu Ser Val Ser Thr Val Ser Arg Ala Leu

40

45

50

50

gcc aac aac gcg agc att ccg gaa tcc aca cgc atc cga gtg gtt gaa 428  
Ala Asn Asn Ala Ser Ile Pro Glu Ser Thr Arg Ile Arg Val Val Glu

55

60

65

55

gcc gct caa aag ctg aac tac cgt ccc aat gcc caa gct cgt gca ttg 476  
Ala Ala Gln Lys Leu Asn Tyr Arg Pro Asn Ala Gln Ala Arg Ala Leu

70

75

80

	cg <sup>g</sup> a <sup>a</sup> g <sup>a</sup> tc <sup>g</sup> ag <sup>g</sup> a <sup>c</sup> a <sup>c</sup> g <sup>a</sup> c <sup>c</sup> a <sup>t</sup> c <sup>t</sup> g <sup>g</sup> t <sup>g</sup> c <sup>a</sup> t <sup>c</sup> a <sup>t</sup> c <sup>a</sup> a <sup>a</sup> c <sup>a</sup> a <sup>t</sup> g <sup>g</sup> a <sup>g</sup>	524	
	Arg Lys Ser Arg Thr Asp Thr Ile Gly Val Ile Ile Pro Asn Ile Glu		
85	90	95	
95	100		
5	a <sup>a</sup> c <sup>c</sup> a <sup>t</sup> t <sup>t</sup> c <sup>t</sup> c <sup>c</sup> t <sup>c</sup> a <sup>t</sup> g <sup>a</sup> c <sup>a</sup> g <sup>a</sup> c <sup>t</sup> g <sup>a</sup> t <sup>t</sup> c <sup>a</sup> a <sup>a</sup> a <sup>a</sup> g <sup>c</sup> t <sup>g</sup> c <sup>t</sup> g <sup>c</sup> t <sup>g</sup>	572	
	Asn Pro Tyr Phe Ser Ser Leu Ala Ala Ser Ile Gln Lys Ala Ala Arg		
	105	110	115
10	g <sup>a</sup> a <sup>g</sup> c <sup>t</sup> g <sup>g</sup> g <sup>g</sup> g <sup>t</sup> g <sup>t</sup> c <sup>c</sup> a <sup>c</sup> c <sup>c</sup> att <sup>t</sup> t <sup>t</sup> g <sup>t</sup> c <sup>c</sup> a <sup>a</sup> c <sup>t</sup> g <sup>a</sup> a <sup>a</sup> c <sup>a</sup> c <sup>c</sup> a <sup>g</sup> g <sup>a</sup>	620	
	Glu Ala Gly Val Ser Thr Ile Leu Ser Asn Ser Glu Glu Asn Pro Glu		
	120	125	130
15	c <sup>t</sup> g <sup>c</sup> t <sup>t</sup> g <sup>g</sup> t <sup>c</sup> a <sup>c</sup> g <sup>a</sup> c <sup>t</sup> t <sup>t</sup> g <sup>g</sup> c <sup>g</sup> at <sup>c</sup> t <sup>a</sup> g <sup>t</sup> g <sup>a</sup> c <sup>c</sup> a <sup>a</sup> c <sup>t</sup> g <sup>c</sup> c <sup>t</sup> g <sup>a</sup> t <sup>g</sup> g <sup>g</sup> a <sup>g</sup>	668	
	Leu Leu Gly Gln Thr Leu Ala Ile Met Asp Asp Gln Arg Leu Asp Gly		
	135	140	145
20	a <sup>t</sup> c <sup>a</sup> t <sup>c</sup> g <sup>t</sup> g <sup>t</sup> g <sup>t</sup> c <sup>c</sup> a <sup>c</sup> c <sup>c</sup> att <sup>c</sup> a <sup>c</sup> g <sup>a</sup> g <sup>a</sup> a <sup>a</sup> c <sup>a</sup> g <sup>t</sup> c <sup>a</sup> c <sup>t</sup> g <sup>a</sup> c <sup>a</sup> t <sup>t</sup> g <sup>t</sup>	716	
	Ile Ile Val Val Pro His Ile Gln Ser Glu Glu Gln Val Thr Asp Leu		
	150	155	160
	gtt <sup>t</sup> a <sup>a</sup> c <sup>a</sup> g <sup>g</sup> g <sup>a</sup> g <sup>t</sup> g <sup>t</sup> c <sup>c</sup> a <sup>g</sup> t <sup>g</sup> g <sup>t</sup> c <sup>t</sup> g <sup>c</sup> g <sup>a</sup> c <sup>a</sup> c <sup>t</sup> g <sup>c</sup> t <sup>t</sup> g <sup>t</sup> a <sup>a</sup> c <sup>a</sup>	764	
	Val Asn Arg Gly Val Pro Val Val Leu Ala Asp Arg Ser Phe Val Asn		
	165	170	175
25	t <sup>c</sup> g <sup>t</sup> c <sup>t</sup> att <sup>c</sup> c <sup>t</sup> t <sup>c</sup> g <sup>t</sup> g <sup>t</sup> acc <sup>t</sup> c <sup>a</sup> g <sup>t</sup> at <sup>c</sup> c <sup>a</sup> g <sup>t</sup> cc <sup>g</sup> gg <sup>c</sup> at <sup>t</sup> g <sup>a</sup> c <sup>t</sup> act <sup>t</sup> g <sup>a</sup> a <sup>a</sup>	812	
	Ser Ser Ile Pro Ser Val Thr Ser Asp Pro Val Pro Gly Met Thr Glu		
	185	190	195
30	g <sup>c</sup> t <sup>g</sup> g <sup>t</sup> g <sup>a</sup> c <sup>t</sup> t <sup>a</sup> c <sup>t</sup> c <sup>t</sup> g <sup>c</sup> a <sup>g</sup> t <sup>g</sup> g <sup>t</sup> c <sup>a</sup> a <sup>t</sup> t <sup>t</sup> g <sup>g</sup> g <sup>c</sup> t <sup>a</sup> c <sup>t</sup> ct <sup>t</sup> g <sup>c</sup> c <sup>g</sup>	860	
	Ala Val Asp Leu Leu Leu Ala Ala Asp Val Gln Leu Gly Tyr Leu Ala		
	200	205	210
35	g <sup>g</sup> c <sup>c</sup> c <sup>g</sup> c <sup>a</sup> g <sup>t</sup> act <sup>t</sup> c <sup>c</sup> act <sup>t</sup> g <sup>g</sup> t <sup>c</sup> a <sup>c</sup> g <sup>t</sup> ct <sup>t</sup> g <sup>c</sup> t <sup>t</sup> a <sup>a</sup> c <sup>a</sup> act <sup>t</sup> tt <sup>t</sup> g <sup>a</sup> a <sup>a</sup>	908	
	Gly Pro Gln Asp Thr Ser Thr Gly Gln Leu Arg Leu Asn Thr Phe Glu		
	215	220	225
40	a <sup>g</sup> a <sup>c</sup> t <sup>a</sup> t <sup>t</sup> g <sup>t</sup> g <sup>t</sup> g <sup>c</sup> c <sup>g</sup> at <sup>c</sup> t <sup>c</sup> g <sup>t</sup> g <sup>c</sup> g <sup>a</sup> g <sup>t</sup> c <sup>t</sup> t <sup>c</sup> g <sup>t</sup> t <sup>c</sup> t <sup>t</sup> g <sup>t</sup> g <sup>c</sup>	956	
	Arg Leu Cys Val Asp Arg Gly Ile Val Gly Ala Ser Val Tyr Tyr Gly		
	230	235	240
	g <sup>g</sup> c <sup>t</sup> a <sup>c</sup> c <sup>g</sup> c <sup>c</sup> caa <sup>g</sup> a <sup>a</sup> t <sup>t</sup> g <sup>g</sup> a <sup>t</sup> t <sup>t</sup> g <sup>g</sup> c <sup>g</sup> at <sup>c</sup> t <sup>c</sup> a <sup>a</sup> g <sup>t</sup> g <sup>t</sup> g <sup>c</sup> t <sup>t</sup> g <sup>t</sup> at <sup>t</sup> g <sup>t</sup> g <sup>c</sup>	1004	
	Gly Tyr Arg Gln Glu Ser Gly Tyr Asp Gly Ile Lys Val Leu Ile Lys		
	245	250	255
45	c <sup>a</sup> g <sup>g</sup> a <sup>g</sup> g <sup>c</sup> c <sup>a</sup> a <sup>a</sup> t <sup>t</sup> g <sup>c</sup> t <sup>t</sup> g <sup>g</sup> t <sup>c</sup> g <sup>a</sup> c <sup>t</sup> t <sup>c</sup> at <sup>t</sup> g <sup>t</sup> at <sup>t</sup> g <sup>c</sup> acc <sup>t</sup> at <sup>c</sup> g <sup>t</sup> g <sup>c</sup>	1052	
	Gln Gly Ala Asn Ala Ile Ala Gly Asp Ser Met Met Thr Ile Gly		
	265	270	275
50	g <sup>c</sup> g <sup>t</sup> t <sup>g</sup> t <sup>g</sup> g <sup>c</sup> t <sup>t</sup> c <sup>t</sup> c <sup>t</sup> g <sup>a</sup> g <sup>t</sup> at <sup>t</sup> g <sup>g</sup> a <sup>a</sup> t <sup>t</sup> tt <sup>t</sup> g <sup>g</sup> a <sup>a</sup> g <sup>t</sup> g <sup>t</sup> at <sup>t</sup> g <sup>t</sup> g <sup>c</sup>	1100	
	Ala Leu Leu Ala Leu His Glu Met Asn Leu Lys Ile Gly Glu Asp Val		
	280	285	290
55	c <sup>a</sup> g <sup>c</sup> t <sup>c</sup> att <sup>t</sup> g <sup>g</sup> g <sup>t</sup> t <sup>t</sup> g <sup>a</sup> t <sup>t</sup> a <sup>a</sup> c <sup>a</sup> c <sup>a</sup> att <sup>t</sup> t <sup>c</sup> c <sup>g</sup> ct <sup>t</sup> g <sup>c</sup> c <sup>a</sup> g <sup>a</sup> a <sup>a</sup> t <sup>t</sup> cc <sup>a</sup>	1148	
	Gln Leu Ile Gly Phe Asp Asn Asn Pro Ile Phe Arg Leu Gln Asn Pro		
	295	300	305
	cc <sup>g</sup> ct <sup>g</sup> ag <sup>c</sup> at <sup>c</sup> att <sup>t</sup> g <sup>a</sup> c <sup>a</sup> g <sup>c</sup> c <sup>a</sup> g <sup>t</sup> a <sup>a</sup> c <sup>a</sup> g <sup>t</sup> at <sup>t</sup> g <sup>g</sup> t <sup>c</sup> g <sup>t</sup> at <sup>t</sup> g <sup>t</sup> g <sup>c</sup>	1196	
	Pro Leu Ser Ile Ile Asp Gln His Val Gln Glu Ile Gly Lys Arg Ala		
	310	315	320

	ttt gag att ctg cag aag ctg atc aat ggg gac acc gcg caa aaa tct Phe Glu Ile Leu Gln Lys Leu Ile Asn Gly Asp Thr Ala Gln Lys Ser 325                   330                   335                   340	1244
5	gtg gtg att cca acg cag ctc agc atc aat gga tca acg gcg gtt tcc Val Val Ile Pro Thr Gln Leu Ser Ile Asn Gly Ser Thr Ala Val Ser 345                   350                   355	1292
10	caa aag gcg gcc gca aag gca gca aaa gca gcc caa aaa gca gcc gcg Gln Lys Ala Ala Ala Lys Ala Ala Lys Ala Gln Lys Ala Ala Ala 360                   365                   370	1340
15	aaa gcc gca cag aac acg caa cac gag gtg agc cta gat ggt gaa ctc Lys Ala Ala Gln Asn Thr Gln His Glu Val Ser Leu Asp Gly Glu Leu 375                   380                   385	1388
20	tgaacaagcg cttcatcagc atgatcctgc accaatcctt cagttggata aagtctccaa 1448 gtcggttggc ccagtcaacg tcattaatca agtgagcatc gatgttcgcc ctggcagggt 1508 gcttgcgctg ttgggtgaaa atggtgcggg taaatctacg ctgatcaaga tgatgtcggt 1568 tgtgtatcag cctgatggcg ggcagattt gg	1600
25		
30	<210> 2 <211> 388 <212> PRT <213> Corynebacterium glutamicum	
35	<400> 2 Met His Leu Arg Ser Leu Ser His Asn Arg Gly Thr Phe Gln Lys Val 1                   5                   10                   15	
40	Gly Glu Glu Met Ala Ser Glu Thr Ser Ser Pro Lys Lys Arg Ala Thr 20                   25                   30	
45	Thr Leu Lys Asp Ile Ala Gln Ala Thr Gln Leu Ser Val Ser Thr Val 35                   40                   45	
50	Ser Arg Ala Leu Ala Asn Asn Ala Ser Ile Pro Glu Ser Thr Arg Ile 50                   55                   60	
55	Arg Val Val Glu Ala Ala Gln Lys Leu Asn Tyr Arg Pro Asn Ala Gln 65                   70                   75                   80	
60	Ala Arg Ala Leu Arg Lys Ser Arg Thr Asp Thr Ile Gly Val Ile Ile 85                   90                   95	
65	Pro Asn Ile Glu Asn Pro Tyr Phe Ser Ser Leu Ala Ala Ser Ile Gln 100                 105                 110	
70	Lys Ala Ala Arg Glu Ala Gly Val Ser Thr Ile Leu Ser Asn Ser Glu 115                 120                 125	
75	Glu Asn Pro Glu Leu Leu Gly Gln Thr Leu Ala Ile Met Asp Asp Gln 130                 135                 140	

Arg Leu Asp Gly Ile Ile Val Val Pro His Ile Gln Ser Glu Glu Gln  
 145 150 155 160

5 Val Thr Asp Leu Val Asn Arg Gly Val Pro Val Val Leu Ala Asp Arg  
 165 170 175

Ser Phe Val Asn Ser Ser Ile Pro Ser Val Thr Ser Asp Pro Val Pro  
 180 185 190

10 Gly Met Thr Glu Ala Val Asp Leu Leu Leu Ala Ala Asp Val Gln Leu  
 195 200 205

Gly Tyr Leu Ala Gly Pro Gln Asp Thr Ser Thr Gly Gln Leu Arg Leu  
 210 215 220

15 Asn Thr Phe Glu Arg Leu Cys Val Asp Arg Gly Ile Val Gly Ala Ser  
 225 230 235 240

20 Val Tyr Tyr Gly Gly Tyr Arg Gln Glu Ser Gly Tyr Asp Gly Ile Lys  
 245 250 255

Val Leu Ile Lys Gln Gly Ala Asn Ala Ile Ile Ala Gly Asp Ser Met  
 260 265 270

25 Met Thr Ile Gly Ala Leu Leu Ala Leu His Glu Met Asn Leu Lys Ile  
 275 280 285

Gly Glu Asp Val Gln Leu Ile Gly Phe Asp Asn Asn Pro Ile Phe Arg  
 290 295 300

30 Leu Gln Asn Pro Pro Leu Ser Ile Ile Asp Gln His Val Gln Glu Ile  
 305 310 315 320

Gly Lys Arg Ala Phe Glu Ile Leu Gln Lys Leu Ile Asn Gly Asp Thr  
 325 330 335

Ala Gln Lys Ser Val Val Ile Pro Thr Gln Leu Ser Ile Asn Gly Ser  
 340 345 350

40 Thr Ala Val Ser Gln Lys Ala Ala Ala Lys Ala Ala Lys Ala Ala Gln  
 355 360 365

Lys Ala Ala Ala Lys Ala Ala Gln Asn Thr Gln His Glu Val Ser Leu  
 370 375 380

45 Asp Gly Glu Leu  
 385

50 <210> 3  
 <211> 20  
 <212> DNA  
 55 <213> Corynebacterium glutamicum  
 <220>  
 <223> Primer ccpAlintA  
 <400> 3

agagctgctt ggtcagactt

20

5 <210> 4

<211> 20

<212> DNA

<213> Corynebacterium glutamicum

10 <220>

<223> Primer ccpAlintB

<400> 4

atccagattc ttggcggtag

20

15

## Patentansprüche

1. Isoliertes Polynukleotid aus coryneformen Bakterien, enthaltend eine für das ccpA1-Gen kodierende Polynukleotidsequenz, ausgewählt aus der Gruppe

5 a) Polynukleotid, das mindestens zu 70% identisch ist mit einem Polynukleotid, das für ein Polypeptid

kodiert, das die Aminosäuresequenz von SEQ ID No. 2 enthält,

10 b) Polynukleotid, das für ein Polypeptid kodiert, das eine Aminosäuresequenz enthält, die zu mindestens zu 70% identisch ist mit der Aminosäuresequenz von SEQ ID No. 2,

c) Polynukleotid, das komplementär ist zu den Polynukleotiden von a) oder b), und

15 d) Polynukleotid, enthaltend mindestens 15 aufeinanderfolgende Nukleotide der Polynukleotidsequenz von a), b), oder c),

wobei das Polypeptid bevorzugt die Aktivität des Katabolit-Kontroll-Proteins CcpA1 aufweist.

20 2. Polynukleotide gemäß Anspruch 1, wobei das Polynukleotid eine in coryneformen Bakterien replizierbare, bevorzugt rekombinante DNA ist.

3. Polynukleotide gemäß Anspruch 1, wobei das Polynukleotid eine RNA ist.

25 4. Polynukleotid gemäß Anspruch 2, enthaltend die Nukleinsäuresequenz wie in SEQ ID No. 1 dargestellt.

5. Replizierbare DNA gemäß Anspruch 2 enthaltend

(i) die Nukleotidsequenz, gezeigt in SEQ ID No. 1, oder

- (ii) mindestens eine Sequenz, die der Sequenz (i) innerhalb des Bereichs der Degeneration des genetischen Kodes entspricht, oder
- 5 (iii) mindestens eine Sequenz, die mit den zu den Sequenzen (i) oder (ii) komplementären Sequenzen hybridisiert, und gegebenenfalls (iv) funktionsneutrale Sinnmutationen in (i).
- 10 6. Polynukleotidsequenz gemäß Anspruch 2, das für ein Polypeptid kodiert, das die Aminosäuresequenz in SEQ ID No. 2 darstellt, enthält.
- 7. Coryneform Bakterien, in denen das ccpA1-Gen abgeschwächt, bevorzugt ausgeschaltet wird.
- 15 8. Escherichia coli Stamm Top10F/pCR2.1ccpA1int als DSM 13636 hinterlegt bei der Deutschen Sammlung für Mikrorganismen und Zellkulturen, Braunschweig, Deutschland.
- 9. Vektor pCR2.1ccpA1int, der
  - 20 9.1. ein 362 bp großes internes Fragment des ccpA1-Gens trägt,
  - 9.2. dessen Restriktionskarte in Figur 1 wiedergegeben wird, und
  - 9.3. der in dem E. coli-Stamm Top10/pCR2.1ccpA1int unter der Nr. DSM 13636 bei der Deutschen Sammlung für Mikroorganismen und Zellenkulturen hinterlegt ist.
- 25 10. Verfahren zur Herstellung von L-Aminosäuren, insbesondere L-Lysin, dadurch gekennzeichnet, dass man folgende Schritte durchführt,

a) Fermentation der die gewünschte L-Aminosäure produzierenden Bakterien, in denen man zumindest das ccpA1-Gen abschwächt,

5 b) Anreicherung des gewünschten Produkts im Medium oder in den Zellen der Bakterien, und

c) Isolieren der L-Aminosäure.

11. Verfahren gemäß Anspruch 10, dadurch gekennzeichnet, dass man Bakterien einsetzt, in denen man zusätzlich weitere Gene des Biosyntheseweges der gewünschten L-Aminosäure verstärkt.

12. Verfahren gemäß Anspruch 10, dadurch gekennzeichnet, dass man Bakterien einsetzt, in denen die Stoffwechselwege zumindest teilweise ausgeschaltet sind, die die Bildung der gewünschten L-Aminosäure verringern.

13. Verfahren gemäß Anspruch 10, dadurch gekennzeichnet, dass man die Expression des (der) Polynukleotids(e), das (die) für das ccpA1-Gen kodiert (kodieren) verringert, insbesondere ausschaltet.

20 14. Verfahren gemäß Anspruch 10, dadurch gekennzeichnet, dass man die regulatorischen Eigenschaften des Polypeptids herabsetzt, für das das Polynukleotid ccpA1 kodiert.

25 15. Verfahren gemäß Anspruch 10, dadurch gekennzeichnet, dass man für die Herstellung von L-Aminosäuren, insbesondere L-Lysin, Bakterien fermentiert, in denen man gleichzeitig eines oder mehrere der Gene, ausgewählt aus der Gruppe

- 15.1 das für die Dihydrodipicolinat-Synthase kodierende Gen dapA,
  - 15.2 das für die Enolase kodierende Gen eno,
  - 15.3 das für das zwf-Genprodukt kodierende Gen zwf,
  - 5 15.4 das für die Pyruvat-Carboxylase kodierende Gen pyc,
  - 15.5 das für den Lysin-Export kodierende Gen lysE,
  - 15.6 gleichzeitig das für die Tetradihydrodipicolinat Succinylase kodierende dapD Gen,
  - 10 15.7 gleichzeitig das Gen für die Succinyldiamino-pimelate-Desuccinylase kodierende dapE Gen,
  - 15.8 gleichzeitig das für die Glyceraldehyd-3-Phosphat Dehydrogenase kodierende gap-Gen,
  - 15.9 gleichzeitig das für die Malat:Chinon Oxidoreduktase kodierende mqo-Gen,
  - 15.10 das für eine feed back resistente Aspartatkina<sup>se</sup> kodierende Gen lysC,
  - 15.11 das für das Zwal-Protein kodierende Gen zwal verstärkt, bevorzugt überexprimiert.
- 20 16. Verfahren gemäß Anspruch 10, d a d u r c h g e k e n n z e i c h n e t, dass man gleichzeitig eines oder mehrere der Gene, ausgewählt aus der Gruppe
- 16.1 das für die Phosphoenolpyruvat-Carboxykinase kodierende Gen pck,
  - 25 16.2 das für die Glucose-6-Phosphat Isomerase kodierende Gen pgi,

16.3 das für die Pyruvat-Oxidase kodierende Gen *poxB*,  
und

16.4 das für das Zwa2-Protein kodierende Gen *zwa2*  
abschwächt.

- 5      17. Coryneforme Bakterien, die einen Vektor enthalten, der  
ein Polynukleotid gemäß Anspruch 1 trägt.
- 10     18. Verfahren gemäß einem oder mehreren der vorhergehenden  
Ansprüche, d a d u r c h g e k e n n z e i c h n e t,  
dass man Mikroorganismen der Gattung *Corynebacterium*  
einsetzt.
- 15     19. Verfahren zum Auffinden von RNA, cDNA und DNA, um  
Nukleinsäuren, beziehungsweise Polynukleotide oder  
Gene zu isolieren, die für das Katabolit-Kontroll-  
Protein CcpA1 kodieren oder eine hohe Ähnlichkeit mit  
der Sequenz des *ccpA1*-Gens aufweisen, d a d u r c h  
g e k e n n z e i c h n e t, dass man die  
Polynukleotidsequenzen gemäß den Ansprüchen 1 bis 4  
als Hybridisierungssonden einsetzt.
- 20     20. Verfahren gemäß Anspruch 19, d a d u r c h  
g e k e n n z e i c h n e t, dass die Hybridisierung  
unter einer Stringenz entsprechend höchstens 2x SSC  
durchgeführt wird.

**Zusammenfassung**

Die Erfindung betrifft isolierte Polynukleotide enthaltend eine Polynukleotidsequenz, ausgewählt aus der Gruppe

- a) Polynukleotid, das mindestens zu 70% identisch ist mit einem Polynukleotid, das für ein Polypeptid kodiert, das die Aminosäuresequenz von SEQ ID No. 2 enthält,
- b) Polynukleotid, das für ein Polypeptid kodiert, das eine Aminosäuresequenz enthält, die zu mindestens 70% identisch ist mit der Aminosäuresequenz von SEQ ID No. 2,
- c) Polynukleotid, das komplementär ist zu den Polynukleotiden von a) oder b), und
- d) Polynukleotid, enthaltend mindestens 15 aufeinanderfolgende Nukleotide der Polynukleotidsequenz von a), b) oder c),

und ein Verfahren zur fermentativen Herstellung von L-Aminosäuren unter Verwendung von coryneformen Bakterien, in denen zummindest das ccpA1-Gen abgeschwächt vorliegt, und die Verwendung der Polynukleotidsequenzen als Hybridisierungssonden.

Figur 1: Plasmidkarte von pCR2.1ccpA1int

5

10

15

20

